

## 한우 정자의 성 분리 시 HEPES를 첨가한 Sheath Fluid가 생존율에 미치는 영향

이지은<sup>1</sup>, 이경진<sup>1</sup>, 유한준<sup>1</sup>, 박정준<sup>3</sup>, 정희태<sup>2</sup>, 양부근<sup>1</sup>, 박춘근<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>강원대학교 수의과대학, <sup>3</sup>명품한우컨설팅

### Effect of Sheath Fluid with HEPES on Viability of Sex-sorted Sperm in Hanwoo (Korean Native Cattle)

Ji-Eun Lee<sup>1</sup>, Kyung-Jin Lee<sup>1</sup>, Han-Jun Yoo<sup>1</sup>, Joung-Jun Park<sup>3</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup>,  
Boo-Keun Yang<sup>1</sup> and Choon-Keun Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>Developmental Biotechnology Laboratory, Myung-poomHanwoo Consulting, Hoengseong 255-807, Korea

#### ABSTRACT

Spermatozoa sorted by flow cytometry have been successfully used to produce offspring in domestic animals and are commercially available for cattle. Also sheath fluid is the important environment for viability of sex-sorted sperm in flow cytometry. The aim of this study was to investigate whether or not HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid) has any effect on the viability in sex-sorted Hanwoo (Korean native cattle) sperm. In this study, the semen was collected from Hanwoo of Hoengseong Livestock Cooperation by artificial vagina method then pooled and subjected to cryopreservation in straws. Sperm were cultured for 0, 30, 60 and 120 min with 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 mM of HEPES added to the sheath fluid and incubated at 4, 20 and 38°C, respectively. For the cytometric analysis the frozen-thawed semen was extended with 5 mM HEPES extender to final concentration ( $2 \times 10^7$  spermatozoa) at 4, 20 and 37°C. Sperm viability was assessed with SYBR-14 and propidium iodide (PI) staining. This study shows that the viability of sperm was decreased with prolongation of incubation time in all of test. But the viability of sperm which were treated with 38°C was gently decreased than that of treated with other temperature. The viability of the control was sharply decreased ( $p < 0.05$ ) than all of the HEPES treatment group at 60 to 120 min in 38°C. X-sexed sperm was more sensitive than Y-sexed sperm to temperature during flow cytometry ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the results of this study suggest that the sheath fluid with 5 mM HEPES has effect on maintenance of viability after sperm sexing at 37°C in Hanwoo.

(Key words : Korean native cattle, flow cytometry, HEPES, sperm, sex-sorting)

#### 서론

산자의 성별을 자유롭게 조절할 수 있는 기술이 개발된다면 축산업에서 상당한 경제적 가치를 지닐 뿐만 아니라 학술 분야에서도 혁신적인 사건으로 기록될 것이다. 이와 관련하여 Schenk 등(1999)은 성 분리가 축산업에 상당한 융통성을 제공함과 동시에 생산 효율성을 증대시키고 유전적인 진보를 가속할 것이라고 언급한 바 있고, 이러한 목적으로 지금까지도 성 분리와 관련된 많은 연구가 진행되고 있다.

성을 인위적으로 조작하기 위한 수많은 노력이 지속되면서 구체적인 방법들이 제시되었는데, H-Y 항원을 이용한 수정란

성 판정(Booman 등, 1989), 핵형 분석을 통한 수정란 성 판정(Willadsen 등, 1999)과 같이 수정란의 성을 판정하여 다시 이식하는 방법이 그 중 하나이다. 또 다양한 성 결정 유전자들의 염기서열이 밝혀지면서(Plucienniczak 등, 1982; Reed 등, 1989; Sinclair 등, 1990; Miller and Koopman, 1990) 연쇄 중합반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 수정란 성 판별이 여러 연구자들에게 매우 유용하게 이용되고 있다. 한편, 수정란을 성 판정하는 방법 외에도 성별을 정하는데 결정적인 역할을 하는 정자를 직접 성 분리하는 방법이 있다. 알부민(Beerink 등, 1993)이나 펄콜(Iizuka 등, 1987)과 같은 물질의 밀도차를 이용하여 X-정자와 Y-정자를 분리해낼 수 있는 밀도구

\* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(Grant No. 109007-03)의 지원으로 수행되었습니다.

\* Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

방법은 사출된 정자와 비교했을 때 성 분리 효과가 거의 없었다(Wang 등, 1994a; Wang 등, 1994b).

또 다른 정자 성 분리 방법으로는 유속세포분리법(flow cytometry)이 있는데, 밀도구배법이 정자의 질량 차이로 분리해낸 것과는 달리 DNA의 함량 차이를 이용한 것으로서 특이적인 형광 염료를 사용하여 DNA를 인식하고, X-정자와 Y-정자를 구별할 수 있게 된다. 이 방법을 이용한 선행 연구에서 토끼(Johnson 등, 1989), 돼지 및 소(Johnson 등, 1999)의 X-정자와 Y-정자가 성공적으로 분리되었으며, 2006년에 물소(buffalo)로서는 처음으로 성 분리된 정자를 이용한 체외수정란을 이식하여 쌍둥이 암컷 송아지가 태어났다(Lu 등, 2007)는 연구 결과도 있다. 유속세포분리법은 기존의 정자 분리 방법에 비해 순도 85% 이상의 높은 정확성을 보여주지만, 몇몇 연구에 따르면 성 분리 후 정자의 활력이나 생존율이 감소한다는 보고가 있어 분리 후 생존율의 중요성을 상기시킨다(Johnson 등, 1999; Grossfeld 등, 2005; Maxwell과 Johnson, 1997a).

한편, HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)는 1966년에 발표된 Good(1966)의 보고서에 언급한 12 가지 완충액 중에 하나로 쌍자이온을 갖는 유기적 화학 완충제이다. 이 완충제에 대하여 직접정자주입술(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)을 수행할 때 pH 변화를 막기 위해 일반적으로 사용된다(Francesco Morgia 등, 2006)는 연구 결과가 있었고, 또한 양의 수정란을 체외배양할 때 12.5 mM의 HEPES가 첨가된 SOF(synthetic oviduct fluid)는 배양 시 pH 변화를 감소시켜줬다고 보고된 바 있다(Walker 등, 1988). 최근 세포연구에 있어 HEPES가 간편한 완충액으로 사용되고 있으나, 일부 세포에서는 적합하지 않다는 결과도 있다(Hanitzsch와 Küppers, 2001).

따라서 본 연구는 유속세포분리 시 시료와 가장 가까운 환경인 sheath fluid에 HEPES를 농도 별로 처리했을 때 정자 생존율과 더불어 방치 시간과 온도 별 처리도 병행하여 유속세포 분리에 있어 가장 적합한 조건을 찾아 한우 정자의 성 분리 후 생존율을 개선하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 채취 및 보존

본 연구에 사용된 정액은 형성축산협동조합의 중모우로부터 인공질법을 통해 채취하였다. 정액 채취 시 인공질의 내부 온도는 36~40℃(평균 38℃)로 유지될 수 있도록 하였다. 채취된 원정액은 희석액(TRILADYL<sup>®</sup>, KRUUSE, Cat. no. 340244)과 1:1 비율로 혼합한 뒤 4℃로 유지된 스티로폼 상자에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 정액은 최종 농도를  $5 \times 10^7$  sperm/ml로 맞춘 뒤, 0.5 ml 스트로우를 이용하여 예비 동결을 거쳐 액체질소에 침지시켜 동결보존하였다.

## 2. 실험 계획

### 1) HEPES 농도 별 단순배양 후 생존율

본 실험에 이용된 HEPES 완충액은 3차 증류수에 111.9 mM NaCl, 4.96 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.95 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 1.05 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.22 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.18 mM Na-pyruvate, 60% lactic acid 0.1755 ml, 0.06 mM penicillin G, 0.07 mM streptomycin sulfate를 혼합하여 기본적인 sheath fluid 완충액을 만들고, 실험을 진행할 때 처리에 따라 다른 농도의 HEPES를 추가하여 사용했다(pH 7.2). 완충액 제조에 사용된 모든 시약은 SIGMA(SIGMA-Aldrich corporation, USA)사의 제품을 이용하였다. HEPES를 첨가한 완충액이 정자의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 38℃ 항온 수조에서 45초간 용해한 동결정액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 동결액을 제거하고,  $2 \times 10^7$  sperm/ml의 농도로 맞추어 각각 0, 2.5, 5, 7.5 및 10 mM HEPES가 함유된 완충액에 노출시켰다. 또한 농도마다 노출 시간에도 차이를 주어 0, 30, 60 및 120분 동안 방치하고 방치 시간이 길어짐에 따라 정자의 생존율이 어떠한 양상을 보이는지 관찰하였다. 한편, 유속세포기를 사용하여 정자 분리실험을 할 때 가장 적절한 온도를 찾기 위해 냉장 온도인 4℃, 실내 온도인 20℃와 한우의 체내 온도와 비슷한 38℃에서 농도 및 시간별 생존율을 검토하였고 총 3회에 걸쳐 반복 실험하였다.

### 2) 유속세포분리 후 HEPES에 의한 생존율

유속세포분리를 실시하기 위하여 한우의 동결정액을 38℃에서 45초간 용해한 후 원심분리(1,500 rpm, 5분)하여 동결액을 제거하였다. 5 mM HEPES 완충액에 부유시킨 정자를 다시 원심분리(1,500 rpm, 5분)로 세척하고, 정자의 농도를 ml당  $2 \times 10^7$ 개가 되도록 같은 완충액으로 희석하였다. 그리고 Hoechst33342로 DNA를 형광 염색하여 전처리를 마친 뒤 강원대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 BD FACSAria™ System(BD, USA)을 통해 4, 20 및 37℃로 온도를 설정한 뒤 정자를 성 분리한 후 생존율을 관찰하였다. 반복 실험을 위하여 같은 과정을 3회 거듭하여 실험 결과를 분석하였다.

### 3. 생존율 검사

정자의 생존율을 검사하기 위해서 Maxwell과 Johnson(1997b) 및 Lee 등(2005)의 방법에 준하여 Live/Dead Sperm viability kit(Molecular probes, USA, L-7011)의 SYBR-14/PI 염색법으로 분석하였다. 염색에 사용될 시약은 각각 DMSO에 0.02 mM의 SYBR-14를 첨가하고 증류수에 2.4 mM의 PI를 혼합하여 원액을 만든 뒤 SYBR-14는 0.187 μM, PI는 38.4 μM을 함유하는 염색약을 만들어 실험하였다. 한우 정액 50 μl를 염색약과 함께 빛이 없는 조건으로 37℃에서 30분간 배양한 후 형광현미

경(×400)을 통해 관찰하였다. 살아있는 정자는 SYBR-14가 염색되어 녹색을 띠고, 죽은 정자는 PI가 투과하여 붉은색을 나타낸다(Thomas 등, 1997).

4. 통계처리

실험을 통해 얻은 수치 결과는 각각의 평균에 대하여 SAS (version 9.1)에서 다양한 형태의 분산분석(ANOVA)을 수행할 수 있는 GLM(General Linear Models) 프로시저를 적용하였고, 던칸다중검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 통계학적으로 분석했다. 유의차는 신뢰도 95%( $p < 0.05$ ) 수준에서 검정하였다.

결 과

서로 다른 온도에서 정자에 HEPES를 농도 별로 처리한 뒤 분석한 결과를 Fig. 1부터 Fig. 3까지 나타냈다. 모든 온도에서 HEPES의 처리 시간이 길어질수록 정자의 생존율은 낮아지는 경향을 보였다. Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 4°C에서 정자를 60분 동안 배양했을 때 5 mM HEPES가 2.5 mM을 제외한 다른 처리구에 비해 생존율이 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 0, 30, 120분간 배양한 처리구에서는 HEPES의 농도 별 생존율간에 유의차는 없었다. 한편, Fig. 2는 20°C에서 정자의 생존율을 측정하여 나타낸 도표이다. 총 120분 동안 처리한 정자에서는 생존율에 유의차가 인정되지 않았고, 30분에서는 HEPES를 첨가하지 않은 대조구에서 유의적으로 가장 높은 생존율을 나타냈다( $p < 0.05$ ). 한편, 60분간 처리한 경우, 2.5 mM 처리구와 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 5 mM의 HEPES

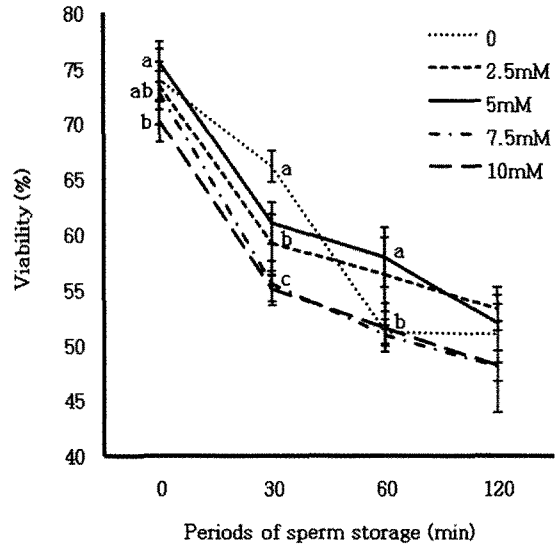


Fig. 2. Effect of different concentrations of HEPES buffer on viability during the sperm storage at 20°C in Hanwoo ( $p < 0.05$ ).

를 혼합한 집단이 가장 높은 생존율을 나타냄을 알 수 있었다. 마지막으로 38°C에서 처리시간이 경과함에 따른 생존율이 다른 온도에 비해 완만하게 하락하는 경향을 보였으나, HEPES를 첨가하지 않은 집단에서는 120분 처리 시 급격하게 생존율이 낮아지는 양상을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 10 mM의 HEPES를 첨가한 처리구는 0, 30 및 60분에서 모두 유의적으로 낮은 생존율을 보였다( $p < 0.05$ ). 비록 2.5 mM HEPES와 유의적 차이를 보이지는 않았지만, 5 mM HEPES는 60분에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

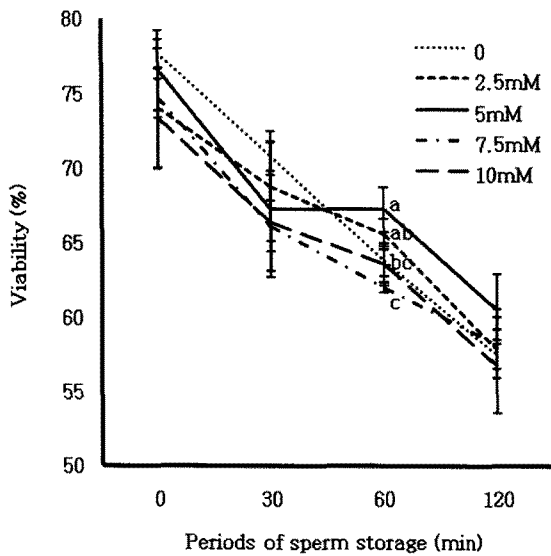


Fig. 1. Effect of different concentrations of HEPES buffer on viability during the sperm storage at 4°C in Hanwoo ( $p < 0.05$ ).

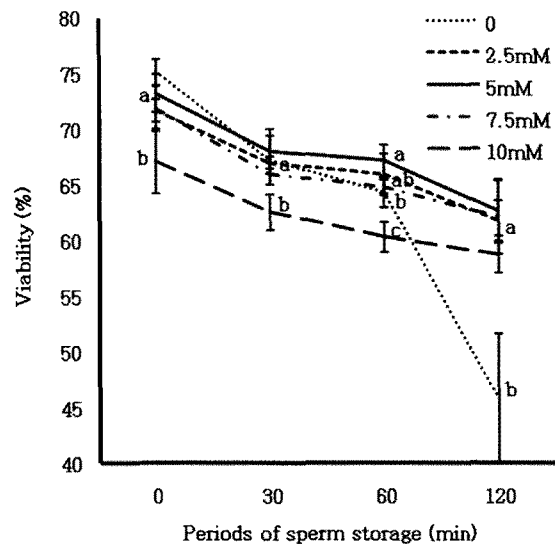


Fig. 3. Effect of different concentrations of HEPES buffer on viability during the sperm storage at 38°C in Hanwoo ( $p < 0.05$ ).

유속세포분리기를 이용하여 온도를 다르게 설정한 뒤 한우의 정자를 성 분리하였고, 분리된 정자는 X-정자와 Y-정자의 생존율을 각각 비교분석하여 도표로 나타냈다(Fig. 4와 Fig. 5). 대조구는 성 분리과정 없이 38℃에서 45초간 동결융해한 정자의 생존율을 분석하여 나타낸 것이다. X-정자의 생존율은 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 37℃는 대조군과 유의적 차이가 인정되지 않았으나, 4℃ 및 20℃에서는 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). 한편, Y-정자의 성 분리에서 온도 차이에 따른 생존율에 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Fig. 5).

고찰

한우 정자의 성 분리 효율을 예측하는 것은 한우 산업에 성

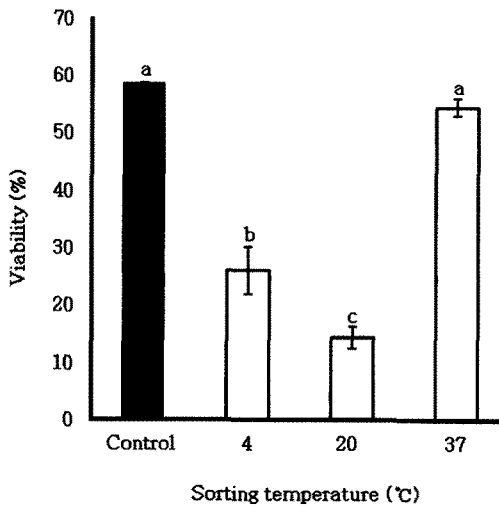


Fig. 4. Viability of X-sperm sorted with different temperature ( $p < 0.05$ ).

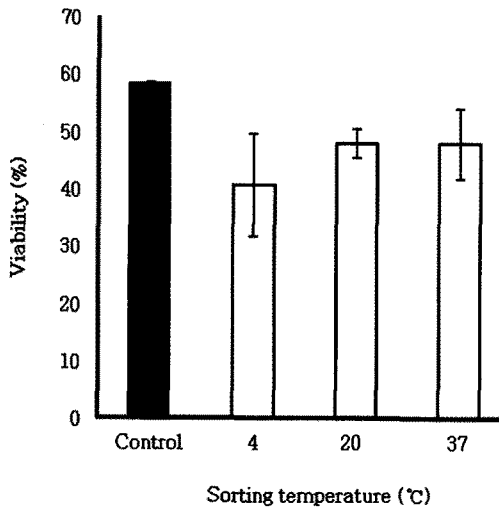


Fig. 5. Viability of Y-sperm sorted with different temperature.

분리를 상업적으로 적용하기 위해서 상당히 중요한 요소이다. 본 실험에 이용한 BD FACSAria™ System(BD, USA) 유속세포분리기에서 sheath fluid는 흐르는 가속도에 의한 수압으로 central core를 통해 모인 세포를 일렬로 나열하는 유체역학적 노즐 효과(hydrodynamic focusing effect)에 결정적인 역할을 하게 된다(Fig. 6). 이 때 central core를 빠져 나온 세포들은 sheath fluid와 직접적인 접촉이 이루어지기 때문에 이 용액이 불안정하면 정자가 손상을 입을 가능성이 있다. 성공적인 정자 성 분리는 반드시 염색, 레이저 노출, 압력 상승에 대한 배우자(gamete)의 민감성과 성 분리 과정동안 일어날 수 있는 배양액의 몇몇 조성 변화를 고려해야만 한다(Maxwell 등, 1998).

또한 동물마다 정자의 생김새나 크기가 다르기 때문에 더욱 효율적인 정자 성 분리가 가능하도록 유속세포분리기 노즐을 개발해야 한다(Garner, 2006). 이러한 요소들 가운데 sheath fluid에 초점을 맞춰 본 연구를 진행한 이유는 완충액의 조성을 보완하는 것이 간편하고 경제적이어서 장비가 달라도 적용이 용이하기 때문이다.

선행 연구에서 sheath fluid로써 양과 고양이에서 TRIS(Leahy 등, 2006; Pope 등, 2009)를, 그리고 소에서 PBS-PVP(Hamano 등, 1999)를 사용한 기록이 있다. 또한 소에서도 TRIS를 이용하여 정자 성 분리를 실시한 연구가 있었고, TRIS(hydroxyethyl) aminomethane(tris 197.0 mM), citric acid monohydrate(55.4 mM)와 fructose(47.5 mM)로 조성되었다(Schenk 등, 1999; Gao 등, 2009).

본 연구의 결과 정자의 생존율은 HEPES의 농도와 상관없이 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보였으나, 38℃에서는 다른 온도에 비해 완만하게 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 38℃에서 HEPES를 첨가하지 않은 대조구는 HEPES가 첨가된 그룹에 비해 60분에서 120분 사이에 생존율이 매우 급격하게 하락했다. 유속세포분리 시 한 마리의 정액을 모두 성 분리하는데 소요되는 시간은 60분에서 120분 사이이다. 이와 같이 정

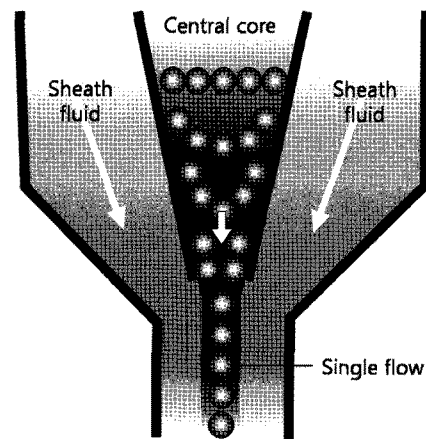


Fig. 6. The hydrodynamic focusing effect of sheath fluid in flow cytometry.

자의 성 분리에 소요되는 시간을 기준으로 비교했을 때 5 mM의 HEPES가 첨가된 배양액을 사용하였을 경우 생존율이 유의적으로 높게 나타났고( $p < 0.05$ ), 특히 38°C에서 처리 시간에 따른 생존율의 감소폭이 적게 나타나 유속세포분리 시 적용할 수 있는 적정 온도라 여겨진다.

5 mM HEPES를 sheath fluid로 사용하여 성 분리한 후의 생존율은 X-정자가 Y-정자보다 온도에 민감하게 반응하였으며, 따라서 X-와 Y-정자 모두 대조구와 유의차가 없었던 37°C에서 분리하는 것이 가장 적합한 조건이라고 생각된다. 농도 실험과 달리 유속세포분리를 통한 실험에서 온도를 37°C로 설정한 이유는 기계 설정에 38°C가 없었기 때문이다. 그러나 37°C에서 유속세포분리를 실시해도 생존율에 있어서 대조구와 유의차는 없는 것으로 보아 5 mM의 HEPES가 포함된 sheath fluid를 이용하여 37°C에서 성 분리를 할 경우, 유속세포분리로 인한 피해가 줄어들어 동결융해 후 정자의 생존율과 차이가 없는 것으로 판단된다.

## 결 론

본 연구는 유속세포분리 시 sheath fluid에 HEPES를 농도, 처리시간 및 온도 별로 처리했을 때 정자 생존율을 분석하여 유속세포분리에 있어 가장 적합한 조건을 찾고 한우 정자의 성 분리 후 생존율을 개선하고자 실시하였다. 그 결과, 정자의 생존율은 HEPES의 농도와 상관없이 시간이 지날수록 낮아지는 경향을 보였다. 특히 한 마리의 정액을 모두 성 분리하는데 소요되는 시간인 60에서 120분 사이를 기준으로 농도 별 생존율에서 2.5와 5 mM의 HEPES가 첨가된 완충액이 유의적으로 높은 생존율을 보였다( $p < 0.05$ ), 비록 2.5 mM과 유의적 차이는 인정되지 않았지만 5 mM HEPES를 첨가했을 때 생존율이 가장 높게 나타났다. 온도별 실험에서는 소의 체내 온도와 비슷한 38°C에서 다른 온도와는 다르게 시간에 따른 생존율 감소가 완만하게 나타났다. 또한 같은 온도에서 HEPES를 첨가하지 않은 완충액을 사용한 처리구는 HEPES를 사용한 모든 처리구보다 60에서 120분 사이에서 매우 급격하게 생존율이 감소하였다( $p < 0.05$ ). 한편, 각각 4, 20 및 37°C에서 유속세포분리 후 성 분리된 X-정자와 Y-정자의 생존율을 분석한 결과, Y-정자에서는 모든 집단에서 유의적인 차이가 없었지만, X-정자에서는 37°C를 제외한 온도처리 집단에서 유의적으로 낮은 생존율을 보였다( $p < 0.05$ ). 따라서 한우 정자의 성 분리에 있어서 5 mM의 HEPES가 첨가된 sheath fluid를 사용하여 37°C에서 실시하는 것이 가장 효율적일 것이라 생각된다.

## 감사의 말

강원대학교 동물자원공동연구소의 기술적 지원에 감사

표합니다.

## 참고문헌

- Beernick FJ, Dmowski WP and Ericsson RJ. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil Steril* 59:382-386.
- Booman P, Kruijt L, Veerhuis R, Hengst AM, Tieman M and Ruch FE. 1989. Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *Livestock Production Science* 23:1-16.
- Francesco Morgia BS, Monica Torti BS, Monica Montigiani BS, Claudio Piscitelli MD, Annalise Giallonardo MD, Mauro Schimberni MD, Pierluigi Giannini MD and Marco Sbracia MD. 2006. Use of a medium buffered with N-hydroxyethyl-piperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of *in vitro* fertilization. *American Society for Reproductive Medicine* 85:1415-1419.
- Gao QH, Wei HJ, Luo J, Han CM, Schoenian S, Du HZ, Lu QS and Qian J. 2009. Flow cytometric sexing of X- and Y-chromosome-bearing sperm in Sika deer (*Cervus nippon*). *Small Ruminant Research* 81:100-104.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65:943-957.
- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S and Singh RMM. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5:467-477.
- Grossfeld R, Kline P, Sieg B, Rath D. 2005. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* 63:2269-2277.
- Hamano KI, Li X, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M and Minato Y. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol. Reprod.* 60:1194-1197.
- Hanitzsch R and Küppers L. 2001. The influence of HEPES on light responses of rabbit horizontal cells. *Vision Research* 41:2165-2172.
- Iizuka R, Kaneko S, Aoki R and Kobayashi T. 1987. Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient and its clinical application. *Hum. Reprod.* 2:573-575.
- Johnson LA, Flook and Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.
- Johnson LA, Welch GR and Rens W. 1999. The Beltsville

- sperm sexing technology: High-speed sperm sorting gives improved sperm output for *in vitro* fertilization and AI. J. Anim. Sci. 77(Suppl 2): 213-220.
- Leahy T, Marti JI, Crossett B, Evan G and Maxwell WMC. 2006. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm. *Theriogenology* 75:962-971.
- Lee SH, Cheong HT, Yang BK and Park CK. 2005. Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature pig semen. *Reprod. Dev. Biol.* 29:247-252.
- Lu YQ, Liang XW, Zhang M, Wang WL, Kitiyanant Y, Lu SS, Meng B and Lu KH. 2007. Birth of twins after *in vitro* fertilization with flow-cytometric sorted buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 100:192-196.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997a. Chlorotetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 46:408-418.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997b. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR and Welch GR. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 10:433-440.
- Miller JR and Koopman M. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim. Genet.* 21:77-82.
- Plucienniczak A, Skowronski L and Jawodski L. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *J. Mol. Biol.* 158:293-304.
- Pope CE, Crichton EG, Gomez MC, Dumas C and Dresser BL. 2009. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by *in vitro* fertilization of oocytes with flow-sorted sperm. *Theriogenology* 71: 864-871.
- Reed KC, Mattaw KI, Mann DA, Beaton S and Matthews ME. 1989. Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides. Patent Cooperation Treaty No. WO 89/07154.
- Schenk JL, Suh TK, Cran DG and Seidel GE, Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52:1375-1391.
- Sinclair AH, Palmer MSB, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf, Lovell-Badge R and Goddell PN. 1989. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM and Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56: 991-998.
- Walker SK, Seaman RF, Quinn P, Wames GM, Asbman RJ, Smith DH and Ancell P. 1988. Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium. *Anim. Reprod.* 11th Int, Dublin, Ireland. 4:483-485.
- Wang HX, Flaherty SJ, Swann NJ and Matthews CD. 1994a. Discontinuous percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: A study using double-fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Reprod.* 9:1265-1270.
- Wang HX, Flaherty SJ, Swann NJ and Matthews CD. 1994b. Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double label fluorescence *in situ* hybridization. *Fertil. Steril.* 61:720-726.
- Willadsen S, Levron J, Munne S, Schimmel T, Marquez C, Scott R and Cohen J. 1999. Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with *in vitro* matured bovine eggs. *Hum. Reprod.* 14:470-475.